

金沢大学 大学院 学生員 高浪正志
 金沢大学 建設工学科 正員 松井三郎
 北陸電力株式会社 橋本 徹

1. はじめに 我々はこれまで枯草菌を用いた変異原物質の検出系の開発・改良をテーマとして研究を進めてきた。そこで今回は、有機塩素系農薬ととりあげ、その変異原性を検討した。これらの物質を利用して、大腸菌の Rec-assay を行い両者の比較を行なった。

2. 実験方法 本法は、枯草菌の野生株 H17 (Rec⁺) と組み換え修復機能欠損株 M45 (Rec⁻) を用いる Rec-assay を液体系で実施し、これに Preincubation の手法を導入したものである。

1) 改良 Rec-assay 液体法 孢子 (spore) 状態にある菌を濁度 (40~60) の対数増殖期まで培養し、一定の濁度 (Rec⁺:20, Rec⁻:40) に N.B. で希釈する。そして、これを L 字管に検定試料 0.6ml, 100mM Na-リン酸緩衝液 0.1ml (これは直接変異原性試験の場合であり、間接変異原性試験の場合には薬物代謝酵素 S-9 mix を 0.1ml 用いる。) と伴に 0.3ml 注入し、振とうせずに Preincubation (37°C, 1hr) がある。その後、N.B. 5.0ml を加え、振とう培養する。検定試料を含まない Control の濁度が 100 になった時点で、検定試料濃度を段階的に変えて注入したすべての L 字管の濁度を測定し、生存率を算出する。なお、大腸菌を用いた改良 Rec-assay 液体法では、増殖速度を考慮し、注入の際の濁度を Rec⁺, Rec⁻ 各々 0.2 とした。

2) チェック機構 Rec⁻ の復帰変異や野生菌の汚染をチェックする意味で、今年度より大価クロムを用いたチェック機構を導入した。L 字管に注入する菌と同じものと、今度は濁度 20 に希釈し、Streak Rec-assay と実験ごとに行う。大価クロムは、強い DNA 損傷性を有し、化学的にも安定で保存 (4°C) が容易である。また、この機構は操作が非常に簡便であり、翌日には使用菌の良否が判定できるという利点がある。

3. 変異原性の評価方法

1) プロビット理論を応用したプロビット間面積 S-probit と Rec-gram

阻害曲線図において、Rec⁺ と Rec⁻ の曲線によって囲まれる面積は、変異原物質の暴露による致死感受性差を示すものと考えることができる。そこで、プロビット値 Y を利用して、この面積 S に対応するプロビット間面積 S-probit を求める。ただし正確な情報を除外する意味で、死亡率 15.9%~84.1% の範囲で計算を行う (図-1 参照)。さらに、増殖阻害濃度レベルの相異を考慮するために S-probit と Rec の 50% 致死濃度で除し、これを Rec-gram として変異原性強度を表現する。従って、次のように

$$\begin{aligned} \text{Rec}^+ \quad Y &= \alpha_1 + \beta_1 \log X \\ \text{Rec}^- \quad Y &= \alpha_2 + \beta_2 \log X \end{aligned}$$

$$S\text{-probit} = \int_4^6 \left\{ \left(\frac{\alpha_2}{\beta_2} - \frac{\alpha_1}{\beta_1} \right) + \left(\frac{1}{\beta_1} - \frac{1}{\beta_2} \right) Y \right\} dY \quad (2)$$

$$\text{Rec-gram} = \frac{S\text{-probit}}{C_{50} \text{ Rec}^-}$$

(1)

X: 検定試料濃度

$\alpha_1, \beta_1, \alpha_2, \beta_2$: Rec⁺ および Rec⁻ の正規分布の母数を示すパラメータ

(3)

6: 15.9% 致死率に対応するプロビット値

4: 84.1% 致死率に対応するプロビット値

2) 標的論を応用した修復可能生存率 RS と単位修復可能生存率 URS 同一検定試料濃度における Rec⁺ と Rec⁻ の生存率の差は、組み換え修復機構の有無によって生ずる差であるから、この縦軸が向の差によって検定試料の

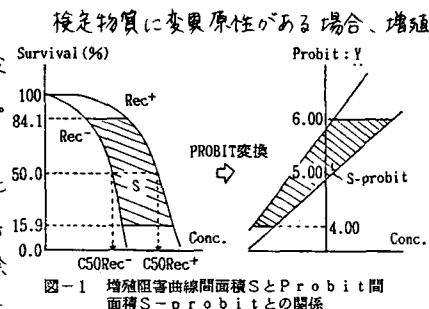


図-1 増殖阻害曲線間面積 S と Probit 間面積 S-probit との関係

変異原性を評価できる(図-2参照)。まず、 Rec^+ と Rec^- の実験結果に標的論を適用する。そして、 Rec^- に平均致死ヒットを与える濃度における Rec^+ と Rec^- の生存率の差を修復可能生存率RSと定義する。さらに、 Rec^- と同様の理論から、このRSを Rec^- の平均致死濃度で除し、単位修復可能生存率URSと定義する。なお、標的論の各ヒットモデル式は次式で示される。

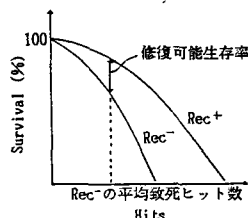


図-2 標的論による修復可能生存率RS

1 ヒットモデル $S = \exp(-\lambda)$ (4) S : 生存率 λ : ヒット数
 n ヒットモデル $S = \exp(-\lambda) \sum_{i=0}^{n-1} \frac{\lambda^i}{i!}$ (5) $\lambda = k \times$ (k : ヒット換算係数, $\times$: 検定試料濃度)

表-1 変異原性の判定基準値

	R S (%)	S-probit
強陽性 (++)	32.0 以上	0.593 以上
陽性 (+)	18.0 ~ 31.9	0.310 ~ 0.592
陰性 (-)	-13.3 ~ 17.9	-0.212 ~ 0.309
逆転 (r)	-13.2 以下	-0.211 以下

3) 変異原性の判定基準値 変異原性を判定するために、陽性対照物質としてDMN、陰性対照物質としてKM、DMSO 2種を採用し、これらの Rec^- assay 液体法の試験結果より判定基準値を設定した。陰性域の基準の設定では、KM、DMSOの数値のばらつきを統一的に処理するために、それぞれRS、S-probitの平均値、分散、標準誤差を求めた分布による95%信頼限界から、陰性域の上限値、下限値と決定した。そのため(-)という基準値が生じた。また、陽性域の決定はDMNのRS、S-probitの上限値をもって強陽性の基準値とした。そして、強陽性の基準値と陰性域の上限の間を陽性とし、陰性域の下限値よりも小さい値を逆転と判断する。なお、RSとS-probitの判断が異なる場合は、陽性側の判断を採用する。

表-2 改良 Rec^- assay 液体法を適用したプロモータ物質と有機塩素農薬のプロビット理論及び標的論による解析結果

Compound	S-g Mix	S-probit	RS (%)	変異原性
Phenobarbital	-	1.046	34.4	++
	+	0.499	20.0	+
Saccharin	-	-0.147	-0.9	-
	+	-0.281	32.6	+
DDT	-	-0.418	-28.9	r
	+	-1.497	-34.4	r
Aldrin	-	-0.510	-9.07	r
	+	0.548	19.53	+
Heptachlor	-	-0.502	-30.66	r
	+	-0.842	-22.27	r
Chlordane	-	-0.067	7.99	-
	+	-0.336	-11.20	r

4. 実験結果および考察 本研究では有機塩素系農薬を4種類選択し、プロモーション活性を示す物質として2種類選択した。実験結果を表-2に示す。

1) 枯草菌を用いた Rec^- assay 液体法 サッカリン、アルドリンに間接変異原性、フェノバルビタールに直接、間接変異原性が確認できた。直接、プロモーション活性物質という点でフェノバルビタール、サッカリン、DDTの試験結果をみると、それぞれ陽性、陰性、逆転と全く異なった判定となった。これには、それぞれのプロモータに臓器特異性があることから、そのプロモーションの作用機序に違いがあり、我々の検出系にも異なる作用を及ぼすためと思われる。また、変異原性の判定の半が逆転したことからも、この現象の解明が急務であるといえる。

2) 大腸菌を用いた Rec^- assay 液体法との比較 今回、我々は逆転現象の解明、検出系の信頼性の向上という点で、大腸菌を用いた Rec^- assay 液体法を試みた。大腸菌は、K12 野生株NK1006 修復機能欠損株NK1024の遺伝子特徴を持つものを用いた。その結果の一例を示したものが図-3である(有機塩素系農薬4種類はすべて同様な結果を得た)。また、比較するうえで枯草菌による実験結果を、図-4に示す。この図より、大腸菌を用いた場合では、全く増殖阻害が得られないことがわかる。従ってこの結果は、逆転現象の遺伝的な裏付けと得るためのデータとしては不十分であるが、大腸菌と枯草菌の膜透過性との違いを明確に示しているといえる。

最後に、本研究を進めるにあたり、終始御指導を頂いた金沢大学癌研究所の吉川寛教授、小笠原直毅助手に感謝致します。

参考文献 1) 松井、高島、橋本、和田; 第39回年次学術講演会講演摘要集2部(II-436、437) 土木学会

2) 橋本徹|枯草菌と大腸菌の Rec^- assayによる水環境変異原物質の検出と評価 金沢大学修士論文

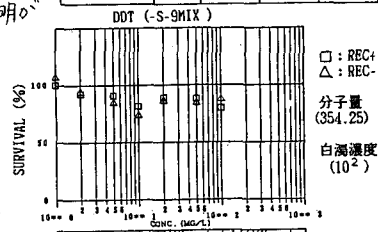


図-3 DDTの大腸菌改良 Rec^- assay 液体法

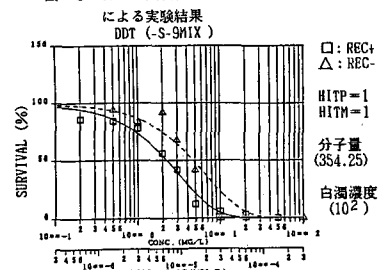


図-4 DDTの枯草菌改良 Rec^- assay 液体法による実験結果